

**ГЕТЕРОГЕННОСТЬ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ TH2-ЛИМФОЦИТОВ И ILC2 В МИКРООКРУЖЕНИИ
МОРФОЛОГИЧЕСКИ ОБОСОБЛЕННЫХ СТРУКТУР ИНВАЗИВНОЙ КАРЦИНОМЫ
МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И СВЯЗЬ С ЛИМФОГЕННЫМ МЕТАСТАЗИРОВАНИЕМ**

Л.С. Ляпунова, К.О. Завгородская, Л.А. Таширева

Научный руководитель: профессор, д.м.н, М.В. Завьялова

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Томский национальный

исследовательский медицинский центр Российской академии наук»,

Россия, г. Томск, пер. Кооперативный, 5, 634009

E-mail: lyapunovalilya@mail.ru

**THE HETEROGENEITY OF TH2-LYMPHOCYTES AND ILC2 THE DISTRIBUTION IN THE
MICROENVIRONMENT OF THE MORPHOLOGICALLY DISTINCT STRUCTURES OF INVASIVE
BREAST CARCINOMA AND THE ASSOCIATION WITH LYMPHOGENOUS METASTASIS**

L.S. Lyapunova, K.O. Zavgorodskaya, L.A. Tashireva

Scientific supervisor: Prof., MD. Zavyalova M.V.

Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences,

Russia, Tomsk, Kooperativny str., 5, 634050

E-mail: lyapunovalilya@mail.ru

Abstract. *Inflammation plays an important role in a tumor disease. Th2 like type of IIR (immunoinflammatory reaction) is associated with an unfavorable course that can be realized by both the adaptive immunity (Th2-lymphocytes) and innate immunity (ILC2). Currently, the prognostic significance of TIL (tumor infiltrating lymphocyte) for triple negative and Her2-positive breast cancer (BC) is showed but not for luminal forms. One of the possible reasons is intratumoral morphological heterogeneity of the invasive breast carcinoma of the nonspecific type (IC NST). In this study, we had shown the heterogeneity of Th2-lymphocytes and ILC2 distribution in the microenvironment of various morphologically distinct structures of the IC NST. In addition, it has been shown that lymph nodes metastasis associated with a high frequency of ILC2 in the microenvironment of trabecular structures of IC NST.*

Введение. Воспаление занимает особое место в возникновении и течении опухолевой болезни. Многочисленные исследования позволили показать, что тип иммуновоспалительной реакции (ИВР), развертывающейся в микроокружении опухоли является одним из решающих факторов прогрессирования заболевания [1]. Так, с неблагоприятным течением связывают Th2 подобный тип ИВР, который может реализовываться как за счет адаптивного звена иммунитета (Th2-лимфоциты), так и за счет клеток врожденного иммунитета (ILC2). ILC (innate lymphoid cells), популяция не цитотоксических лимфоцитов, открытая D. Artis и Н. Spits менее десяти лет назад, имеет сходство с различными субтипами Т-лимфоцитов как на уровне факторов транскрипции, регулирующих их дифференцировку, так и продуцируемых цитокинов. В отличие от адаптивного звена иммунной системы ILC не имеют антигенспецифических рецепторов, а реагируют на различные врожденные сигналы [2,3].

В настоящее время показана прогностическая значимость TIL для тройного негативного и Her2-позитивного рака молочной железы (РМЖ), но не для люминальных его форм [4]. Существует мнение, что одной из причин подобного развития событий может служить внутриопухолевая морфологическая гетерогенность инвазивной карциномы неспецифического типа (ИКНТ) молочной железы. ИКНТ молочной железы характеризуется формированием различных морфологически обособленных опухолевых структур, среди которых можно выделить: тубулярные, альвеолярные, солидные, трабекулярные и дискретные группы клеток, а также широкой вариабельностью их сочетания в пределах одного опухолевого узла [5]. Внутриопухолевая морфологическая гетерогенность лежит в основе гистологической классификации РМЖ, а оценку количества тубулярных структур, наряду с ядерным полиморфизмом и митотическим индексом, используют для определения степени злокачественности карцином. При этом РМЖ относящиеся к одному гистологическому классу часто характеризуются различным клиническим течением [6]. Возможными объяснениями данного феномена могут являться неоднородность распределения клеток иммунного инфильтрата в строме опухоли, а также разнообразие его субпопуляционного состава.

Таким образом, целью нашего исследования являлась оценка связи лимфогенного метастазирования с наличием Th2-лимфоцитов и ILC2 вблизи различных морфологических структур инвазивной карциномы молочной железы люминального типа.

Материал и методы исследования. В исследование были включены 10 больных с ИКНТ молочной железы люминального В типа T1-4N0-3M0 проходивших лечение в отделении общей онкологии НИИ онкологии Томского НИМЦ. Средний возраст пациенток составил 56 лет (от 44 до 70 лет). Для анализа был использован операционный материал, полученный при радикальной мастэктомии или секторальной резекции. Терапия в неоадьювантном режиме ни одной из пациенток не проводилась. Из свежезамороженных образцов опухолевой ткани были приготовлены гистологические срезы окрашенные гематоксилином, а затем при помощи технологии лазерной микродиссекции PALM (Carl Zeiss, Германия) выделено микроокружение вблизи альвеолярных, тубулярных, солидных, трабекулярных опухолевых структур и отдельных групп опухолевых клеток. У каждой пациентки было изолировано не менее 100 морфологических структур каждого типа. Согласно адаптированному протоколу сорбентно-колоночным методом с помощью наборов RNeasy Plus Micro Kit (Qiagen, США) была выделена тотальная РНК, а затем с использованием набора QuantiTect WTA Kit (Qiagen, США) проведена амплификация транскрипта. С помощью метода полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с использованием технологии TaqMan была оценена экспрессия генов CD3, CD4 и GATA3 относительно гена рефери - ACTB.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета программ «Statistica 8.0». Для сравнения частоты встречаемости экспрессии маркерных генов применялся точный критерий Фишера, а результаты считались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты. На основании оценки экспрессии генов CD3, CD4 и GATA3 в образцах мы определяли присутствие двух типов клеток в микроокружении ИКНТ: сочетанная экспрессия генов CD3 и/или CD4 и GATA3 соответствовала присутствию Th2-лимфоцитов, экспрессия GATA3 без экспрессии генов CD3 и CD4 – ILC2.

Нами было показано, что в микроокружении тубулярных структур изучаемые клетки не встречались. В микроокружении альвеолярных структур и дискретных групп опухолевых клеток Th2-лимфоциты встречались в 10 % случаев, ILC2 – в 20 % случаев. В микроокружении солидных структур Th2-лимфоциты и ILC2 встречались в 20 % и 30 % случаев соответственно. А в микроокружении трабекулярных структур в 40 % случаев встречались ILC2, Th2-лимфоциты вблизи данного типа структур не встречались.

Затем мы оценили частоты встречаемости Th2-лимфоцитов и ILC2 в микроокружении различных морфологических структур ИКНТ молочной железы у больных с наличием и отсутствием лимфогенных метастазов. Оказалось, что достоверное чаще у больных ИКНТ с пораженными лимфатическими узлами в микроокружении трабекулярных структур встречаются ILC2 по сравнению с больными без лимфогенных метастазов (16,7 % и 75,0 % соответственно, $p < 0,05$)

Заключение. В результате исследования была показана гетерогенность распределения Th2-лимфоцитов и ILC2 в микроокружении различных морфологически обособленных структур ИКНТ молочной железы. Кроме того показано, что наличие пораженных лимфатических узлов у больных ИКНТ связано с большей частотой встречаемости ILC2 в микроокружении трабекулярных структур.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Таширева Л.А., Перельмутер В.М., Манских В.Н. и др. Типы иммунновоспалительных реакций как алгоритмы взаимодействия клеток в условиях репаративной регенерации и опухолевого роста // Биохимия. – 2017. – Т. 82. – № 5. – С. 732–748.
2. Artis, D., Spits, H. (2015). The biology of innate lymphoid cells. *Nature*, no. 7534, pp. 293-301.
3. Таширева Л.А., Завгородская К.О., Перельмутер В.М. Роль лимфоидных клеток врожденного иммунитета в течении опухолевой болезни // Цитология. – 2016. – Т. 58. – № 12. – С. 901–907.
4. Dushyanthen, S., Beavis, P. A., Savas, P., Teo, Z. L., Zhou, C., Mansour, M., Darcy, P. K., Loi, S. (2015). Relevance of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer. *BMC Medicine*, no. 13, pp. 202.
5. Gerashchenko, T. S., Zavyalova M. V., Denisov E. V., Krakhmal N. V., Pautova D. N., Litviakov N. V., Vtorushin S. V., Cherdyntseva N. V., Perelmuter V. M. (2017). Intratumoral morphological heterogeneity of breast cancer as an indicator of the metastatic potential and tumor chemosensitivity. *Acta Naturae*, no. 1, pp. 56–67.
6. Masood, S. (2016). Breast cancer subtypes: morphologic and biologic characterization. *Women's Health*, no. 1, pp. 103–119.